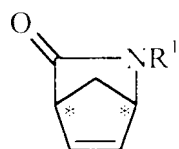
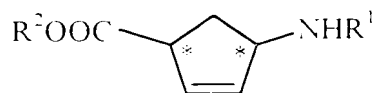


**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formeln

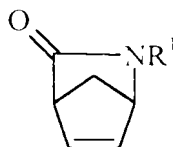


I



II

ausgehend von einem Lactam der allgemeinen Formel



III

Verbindungen der Formel I wie bspw. (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, welches wiederum ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von carbocyclischen Nukleosiden wie z. B. Carbovir (Campbell et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 4602-4616) ist. Verbindungen der Formel II wie bspw. der (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäurepropylester sind ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von (1S,4R)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, welches ebenfalls ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von carbocyclischen Nukleosiden sein kann

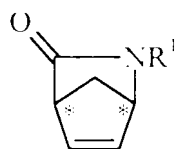
Bekannt ist lediglich die chemische Herstellung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on durch Acylierung von (1R,4S)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Katagiri et al., Tetrahedron Letters, 1997, 38, 1961). Gemäss dieses Verfahrens kann (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on nur vom entsprechenden (1R,4S)-2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on als Edukt erhalten werden. Dieses Edukt ist zu kostspielig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I und II bereitzustellen, welche aus leicht erhaltlichem, billigem,

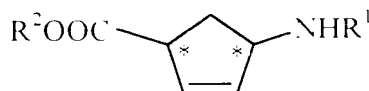
Ausgangsmaterial in guter Enantiomerenreinheit hergestellt werden können

Diese Aufgabe wird mit dem neuen biotechnologischen Verfahren gemäss Anspruch 1 gelöst

Das erfindungsgemasse Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln

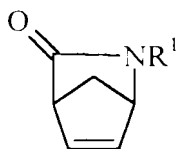


I



II

worin R¹ Acyl oder Acyloxy und R² ein Wasserstoffatom oder C<sub>1-10</sub>-Alkyl bedeutet, erfolgt mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich ausgehend von einem racemischem Lactam der Formel



III

Das Ausgangsmaterial, das Lactam der allgemeinen Formel III (Substrat) kann beispielsweise gemäss Taylor et al. (Tet. Asymmetry 4, 1993, 1117) hergestellt werden

C<sub>1-10</sub>-Alkyl ist linear oder verzweigt sowie substituiert oder unsubstituiert.

Beispiele für C<sub>1-10</sub>-Alkyl sind Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Isobutyl, tert. Butyl, Isopropyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl und seine Isomere sowie Chlormethyl, Brommethyl, Dichlormethyl, Dibrommethyl, Chlorpropyl, Brombutyl.

Acyl bedeutet Alkanoyl oder Arylcarbonyl. Alkanoyl ist zweckmassig C<sub>1-4</sub>-Alkanoyl, das substituiert oder unsubstituiert sein kann. Unter substituiertem C<sub>1-4</sub>-Alkanoyl wird im folgenden mit einem oder mehreren Halogenatomen substituiertes verstanden. Beispiele für C<sub>1-4</sub>-Alkanoyl sind Acetyl, Propionyl, Butyryl, Chloracetyl, Bromacetyl, Dichloracetyl. Arylcarbonyl ist zweckmassig Benzylcarbonyl oder Phenylcarbonyl, substituiert oder unsubstituiert.

Acyloxy bedeutet Alkoxy carbonyl oder Aryloxy carbonyl. Alkoxy carbonyl ist zweckmassig C<sub>1-4</sub>-Alkoxy carbonyl wie Methoxy carbonyl, Ethoxy carbonyl, Propoxy carbonyl, Butoxy carbonyl oder tert-Butoxy carbonyl (BOC). Aryloxy carbonyl ist zweckmassig

Benzoyloxy carbonyl oder Phenoyloxy carbonyl.

Vorzugsweise bedeutet R¹ C<sub>1-4</sub>-Alkanoyl oder C<sub>1-4</sub>-Alkoxy carbonyl insbesondere Acetyl oder Ethoxy carbonyl.

Als Hydrolasen können Proteasen oder Lipasen, vorzugsweise Proteasen wie Serinproteasen eingesetzt werden. Als Serinproteasen können bspw. Chymotrypsine, Trypsine und Subtilisine (bakterielle Serinproteasen) eingesetzt werden. Als Subtilisine können kaufliche Subtilisine wie Subtilisin A, Subtilisin B, Alcalasen, ALK-Enzyme, Bacillopeptidase A, Bacillopeptidase B, Bioprasen, Colistinasen, Esperasen, Genenase I, Kazusase, Maxacal, Maxatasen, Nagasen, Peptidasen, Protease S, Protease VIII, Protease XXVII, Proteinasen, wie die alkaline Proteinase von *Bacillus subtilis* oder *Aspergillus oryzae*, Proteinase K von *Tritirachium albumin*, Savinasen, Subtilopeptidasen, Superasen, Thermoasen verwendet werden. Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Savinasen durchgeführt. Als Savinasen sind Savinase 12 Type W<sup>TM</sup>, Savinase 16 0L Type - EX<sup>TM</sup>, Savinase 32 0L Type - EX<sup>TM</sup>, Savinase 4 0T Type W<sup>TM</sup> und Savinase 8 0L<sup>TM</sup> geeignet. Als Lipase kann bspw. Lipase aus *Candida antarctica* verwendet werden.

Werden als Hydrolasen Proteasen, wie Savinasen, Proteasen von *Bacillus subtilis*, Proteasen von *Aspergillus oryzae*, Proteinase K von *Tritirachium albumin* eingesetzt, wird zweckmassig im racemischem Lactam der Formel III das (1S,4R)-Enantiomere in die entsprechende Verbindung der allgemeinen Formel II hydrolysiert wobei das (1R,4S)-Enantiomere der allgemeinen Formel I anfällt. Werden als Hydrolasen Lipasen wie Lipase von *Candida antarctica* eingesetzt, wird zweckmassig im racemischen Lactam der Formel III das (1R,4S)-Enantiomere in die entsprechende Verbindung der allgemeinen Formel II hydrolysiert wobei das (1S,4R)-Enantiomere der allgemeinen Formel I anfällt.

Als Nucleophil können Hydroxidionen, Wasser oder C<sub>1-10</sub>-Alkohole eingesetzt werden. Als C<sub>1-10</sub>-Alkohole sind geeignet Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, tert-Butanol, Isobutanol, Pentanol, Hexanol, Heptanol, Oktanol, Nonanol oder das Decanol. Wird als Nucleophil ein C<sub>1-10</sub>-Alkohol eingesetzt, wird wie fachmannisch bekannt der entsprechende Ester der allgemeinen Formel II (R<sup>2</sup>=C<sub>1-10</sub>-Alkyl) gebildet. Wird als Nucleophil Wasser eingesetzt, wird selbstverständlich die entsprechende Saure der allgemeinen Formel II (R<sup>2</sup>=H) gebildet.

Abhängig von der Hydrolase und dem Substrat (Lactam der Formel III) wird die Biotransformation zweckmassig zwischen pH 5 und 12, vorzugsweise zwischen pH 6 und 8, durchgeführt. Erfindungsgemäss wird dabei bei einer gegebenen Hydrolase und einem gegebenen Substrat der pH-Wert in Gegenwart einer Base konstant gehalten. Zweckmassig wird der pH-Wert durch Zugabe einer Base um + - 0.5 pH-Einheiten konstant gehalten. Wird z.B. als Substrat racemisches 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R<sup>1</sup>=

Acetyl) und als Hydrolase Savinase eingesetzt, wird der pH-Wert vorzugsweise zwischen pH 7.0 und pH 7.5 konstant gehalten

Als Base kann eine anorganische oder organische Base eingesetzt werden. Als anorganische Basen sind z. B. KOH, NaOH, geeignet. Als organische Base kann beispielsweise

5 Triethanolamin gelöst in einem organischen Lösungsmittel geeignet sein

Wird als Nucleophil einer der oben beschriebenen Alkohole verwendet, kann als Base das entsprechende Alkoholation dienen

10 Die Reaktionstemperatur kann in einem Bereich von 10 bis 60 °C, vorzugsweise von 15 bis 40 °C, liegen

Zweckmassig wird die Biotransformation in Wasser, einer Pufferlösung, einem C<sub>1-10</sub>-

Alkohol oder in einem Gemisch von diesen mit einem aprotischen organischen Lösungsmittel durchgeführt. Als aprotische organische Lösungsmittel sind bspw. Ether, aromatische

15 Kohlenwasserstoffe geeignet. Als Ether können Tetrahydrofuran, Dioxan oder tert-Methylbutyl-ether verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe sind Toluol und Benzol geeignet. Als Pufferlösungen können z. B. niedermolare wie 10-100mM Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer, Hepes-Puffer verwendet werden. Als C<sub>1-10</sub>-Alkohole können die zuvor beschriebenen eingesetzt werden.

20

Die Biotransformation kann auch derart durchgeführt werden, dass das Lactam der allgemeinen Formel III als Lösungsmittel dient. Dann wird zweckmässig die Biotransformation in Gegenwart der Hälfte der stöchiometrischen Mengen an Wasser oder des entsprechenden Alkohols durchgeführt.

25

Je nach Lösungsmittel kann die Biotransformation in einem Zweiphasen- oder Einphasensystem durchgeführt werden. Zweckmässig wird die Biotransformation in einem Einphasensystem durchgeführt

30

Nach einer üblichen Umsetzungszeit von wenigen Stunden werden dann abhängig von dem gewählten Ausgangsmaterial die gewünschten optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II in hervorragender Ausbeute und Enantiomerenreinheit erhalten. Die bevorzugten Ausgangsmaterialien sind racemisches 2-Acetyl-2-

azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R<sup>1</sup> = Acetyl) und racemisches 2-Ethoxycarbonyl-2-

35

azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on. Die bevorzugten Produkte der Verbindungen der allgemeinen Formel I sind (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R<sup>1</sup> = Acetyl) und (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (R<sup>1</sup> =

Ethoxycarbonyl). Die bevorzugten Verbindungen der allgemeinen Formel II sind (1S,4R)-1-

Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäure ( $R^1 = \text{Acetyl}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ), (1S,4R)-1-

Ethoxycarbonyl-2-cyclopenten-4-carbonsäure ( $R^1 = \text{Ethoxycarbonyl}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ), (1S,4R)-1-

Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäuremethylester ( $R^1 = \text{Acetyl}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ), (1S,4R)-1-

Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäurebutylester ( $R^1 = \text{Acetyl}$ ,  $R^2 = \text{C}_4\text{H}_9$ ), (1S,4R)-

5 Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäureethylester ( $R^1 = \text{Acetyl}$ ,  $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5$ ) und (1S,4R)-

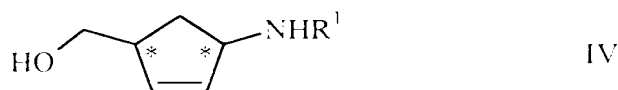
1-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäurepropylester ( $R^1 = \text{Acetyl}$ ,  $R^2 = \text{C}_3\text{H}_7$ )

Die (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäure- $\text{C}_{2-10}$ -alkylester, ausgenommen der  
(1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäureethylester, vorzugsweise der

10 (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-4-carbonsäureethylester und der (1S,4R)-Acetylamino-  
2-cyclopenten-4-carbonsäurepropylester der allgemeinen Formel II sind in der Literatur  
noch nicht beschrieben und demzufolge ebenfalls Bestandteil der Erfindung

Ein weiterer Bestandteil der Erfindung ist die Weiterumsetzung, die Reduktion der Verbin-  
dung der allgemeinen Formel I, zu einem optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-

15 cyclopenten-Derivat, insbesondere zu einem (1R, 4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-  
cyclopenten-Derivat der allgemeinen Formel



20 worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat

Zweckmassig wird die Reduktion mit binären oder komplexen Metallhydriden der Bor- oder  
Aluminiumgruppe durchgeführt wie mit Alkalimetall-, Erdalkalimetallborhydriden,

Alkalimetall-, Erdalkalimetallaluminiumhydriden

25 Als binäre Alkalimetall- oder Erdalkalimetallborhydride können  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{LiBH}_4$ ,  $\text{KBH}_4$ ,

$\text{NaAlH}_4$ ,  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{KAlH}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{BH}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{AlH}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{AlH}_4)_2$  verwendet werden

Komplexe Metallhydride der Bor- oder Aluminiumgruppe können die allgemeine Formel  $M^1$

$M^2 H_n L_m$  haben, worin n eine ganze Zahl von 1 bis 4 ist und m eine ganze Zahl von 4 bis 4

30 bedeutet und L  $\text{C}_{1-4}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-4}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{1-4}$ -Alkoxy, CN oder ein Amin ist, oder die

komplexen Metallhydride können die allgemeine Formel  $M^2 H_n O L_p$  haben, worin  $M^2$  die

genannte Bedeutung hat und O eine ganze Zahl von 0 bis 3 ist und p eine ganze Zahl von 3

bis 3 minus der entsprechenden Zahl p ist. Als  $M^1 M^2 H_n L_m$  können  $\text{LiBH}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ ,  $\text{LiBH}_x$   
( $\text{OCH}_3$ ) $_{4-x}$ , worin x eine ganze Zahl von 1 bis 3 bedeutet,  $\text{LiAlH}(\text{OC}(\text{CH}_3)_3)_3$ ,

35  $\text{NaAlH}_2(\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_3)_2$ ,  $\text{NaAlH}_2(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  oder  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  eingesetzt werden. Vorzugsweise  
wird die Reduktion mit einem Metallborhydrid wie Natriumborhydrid durchgeführt

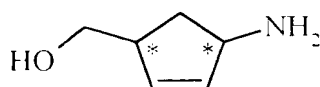
Zweckmassig werden die Metallhydride in einem molaren Verhältnis von 0,5 bis 1 pro mol der Verbindung der allgemeinen Formel I eingesetzt

5 Zweckmassig wird die Reduktion unter Inertgasatmosphäre wie beispielsweise unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt

Die Reduktion kann bei einer Temperatur von  $-10$  bis  $30^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise bei einer Temperatur von  $0$  bis  $10^{\circ}\text{C}$ , durchgeführt werden

10 Als Lösungsmittel sind für die Reduktion sekundäre oder tertiäre Alkohole geeignet. Als sekundärer Alkohol kann bspw. 2-Butanol und als tertiärer Alkohol kann bspw. tert. Amylalkohol eingesetzt werden. Vorzugsweise wird ein sekundärer Alkohol eingesetzt

15 Die Weiterumsetzung, die Hydrolyse der optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivate der Formel IV zu den entsprechenden optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten bzw. deren Salze, der Formel



V

20 mit einem Erdalkali-, Alkalimetallhydroxid oder mit einer Mineralsäure ist ebenfalls Bestandteil der Erfindung. Insbesondere wird das (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivat zum (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten hydrolysiert

25 Als Alkalimetallhydroxid ist Lithium-, Natrium- oder Kaliumhydroxid geeignet. Als Erdalkalimetallhydroxid kann bspw. Bariumhydroxid eingesetzt werden. Als Mineralsäuren sind Halogenwasserstoffsäuren wie bspw. Salzsäure oder Bromwasserstoffsäure geeignet

Zweckmassig wird die Hydrolyse bei einer Temperatur von  $50$  bis  $120^{\circ}\text{C}$ , vorzugsweise von  $90$  bis  $100^{\circ}\text{C}$ , durchgeführt

30 Als Salze des (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopentens (Formel V) sind dessen Hydrohalogenidsalze wie Hydrochloride oder Hydrobromide geeignet

## Beispiele

### Beispiel 1

Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten ausgehend von  
5 racemischem ( $\pm$ )-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

#### 1.1 Herstellung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

##### 1.1.1 mittels Savinase in einem Gemisch von Natriumphosphat-Puffer und 10 Tetrahydrofuran

5 ml Tetrahydrofuran wurden mit 3,84 ml 20 mM Natrium-Phosphatpuffer  
pH 7 und 1,16 ml Savinase 16 0 L Type EX, Novo Nordisk (16 KNU/g,  
Kilo Novo Protease Units) gemischt. Zu dem Ansatz wurden 417  $\mu$ l, (+/-) 2-  
15 Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (330 mmol/l) gegeben. Die  
Reaktion wurde mit einem Magnetrührer gemischt und mittels eines  
Wasserbades bei 30°C gehalten. Der pH-Wert wurde durch eine pH-  
Regelung mit 1M NaOH konstant bei pH 7 gehalten. Proben wurden  
periodisch entnommen und mit HPLC auf Gehalt und  
20 Enantiomerenüberschuss analysiert (Chiralpak AD, Daicel Chemical Ltd  
(0,46 x 25 cm), isokratisch bei Raumtemperatur, Fluss 1 ml/min mit n-  
Heptan (Ethanol 2%, Detektion bei 215 nm)). Insgesamt wurden dabei 1,25  
ml NaOH verbraucht. Nach 120 Minuten war 50% der eingesetzten Menge  
an (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on zur entsprechenden  
25 Saure hydrolysiert. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mit achiraler GC. Die  
Analytik wurde mit Gaschromatographie wie folgt durchgeführt: Kapillar-  
Saule HP-5 (5% Phenylmethylsiloxan), Temperaturgradient 100 °C – 260  
°C, die Proben wurden für die Analyse in Tetrahydrofuran 1:1 verdünnt.

##### 1.1.2 in Wasser

30 1.1.2.1 Zu 419,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden 60  
ml H<sub>2</sub>O und 35 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 gegeben. Der pH-Wert  
wurde mit 7,5 N NaOH auf 7,5 gehalten, der 1l-Applikon Fermenter wurde  
mit 400 Upm gerührt. Gemäss Beispiel 1.1.1 wurden Proben periodisch  
entnommen und analysiert. Nach 45 h wurde ein ee-Wert von 99%  
35 gemessen.

Der Ansatz wurde über ein Whatman GF/F Filter abgenutscht und der  
Filterkuchen wurde 2 mal mit 100 ml und 1 mal mit 50 ml Butylacetat  
gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit 200 ml Butylacetat

ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotavap eingeeengt. 144,8 g Produkt mit einem ee-Wert von  $> 98\%$  wurden erhalten, was einer Ausbeute von  $31\%$  bez. des Racemats entsprach. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

**1.1.2.2** Zu 486,3 g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt  $95,4\%$ ) wurden 60 ml  $H_2O$  und 35 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 gegeben. Der pH-Wert wurde mit 7,5 N NaOH auf 7,5 gehalten, der 11-Applikon Fermenter wurde mit 400 Upm gerührt. Gemäss Beispiel 1.1.1 wurden Proben periodisch entnommen und analysiert. Nach 45 h wurde ein ee-Wert von  $> 98\%$  gemessen. Insgesamt wurden 174,6 ml 7,5 N NaOH verbraucht.

Der Ansatz wurde über ein Whatman GF/F Filter abgenutscht und der Filterkuchen wurde 2 mal mit 100 ml und 1 mal mit 50 ml Butylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde 2 mal mit 200 ml Butylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotavap eingeeengt. 144,8 g Produkt mit einem ee-Wert von  $> 98\%$  (Gehalt  $92,5\%$ ) wurden erhalten, was einer Ausbeute von  $29\%$  bez. des Racemats entsprach. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

### 1.1.3 in Methanol

72,3 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt  $95,4\%$ ) wurden mit 8,3 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 und 19,4 ml Methanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von 24 h bei  $30^\circ C$  gerührt. Der pH blieb dabei konstant bei 7,2. Proben wurden nach Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 25 h wurde ein ee-Wert von  $> 98\%$  erreicht und die Reaktion wurde beendet. Die analytische Ausbeute betrug  $42\%$  bez. des Racemats. Dabei bildete sich in stöchiometrischen Mengen der entsprechende Methylester ( $R^2 = CH_3$ ) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was mit GC-MS bewiesen wurde. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

### 1.1.4 in Butanol

72,3 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt  $95,4\%$ ) wurden mit 76,86 ml 1-Butanol und 8,3 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von 22 h gemessen. Nach dieser Zeit wurde ein ee-Wert von  $> 98\%$  mit HPLC



bestimmt. Der pH-Wert wurde mit 4 N NaOH bei pH 7,5 konstant gehalten. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Die Reaktionstemperatur lag bei 30°C. Es bildete sich freie Säure ( $R^2 = H$ ) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was anhand von HPLC bewiesen wurde und der Butylester ( $R^2 = C_4H_9$ ) der Verbindung der allgemeinen Formel II, was anhand von GC-MS bewiesen wurde. Eine analytische Ausbeute von 34,8% bez. des Racemats wurde erreicht.

### 1.1.5 mittels Savinase in 1-Propanol

**1.1.5.1** 242g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on, 168,6 ml 1-Propanol und 28 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 wurden bei 30°C und bei einem pH von 7,0 (eingestellt mit 4 N NaOH) inkubiert. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 24 h wurde der ee-Wert des Produktes zu % ee = 99% ermittelt. Die analytische Ausbeute betrug 47%. Anschliessend wurden zu dieser Mischung (459 ml) 100 ml Toluol hinzugegeben und das Propanol unter reduziertem Druck abgedampft. Dann wurde die Lösung zweimal mit Toluol (250 ml) und Wasser (100 ml) extrahiert. Toluol wurde abgedampft und das Produkt destilliert. Es wurden 113,9 g (0,69 mol) Produkt (Reinheit 93%, ee = 99%) entsprechend einer Ausbeute von 45,7% bez. des Racemats erhalten. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

**1.1.5.2** 208g (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt 95,4%), 168,6 ml 1-Propanol und 23 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 wurden bei 30°C und bei einem pH von 7,2 (eingestellt mit 4 N NaOH) im Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach 30 h wurde der ee-Wert des Produktes zu % ee = > 98% ermittelt. Anschliessend wurden zu dieser Mischung (459 ml) 100 ml Toluol hinzugegeben und das Propanol unter reduziertem Druck abgedampft. Dann wurde die Lösung zweimal mit Toluol (250 ml) und Wasser (100 ml) extrahiert. Toluol wurde abgedampft und das Produkt destilliert (12 mbar, 85 - 95°C). Es wurden 79,13 g (0,69 mol) Produkt (Reinheit 93%, ee > 98%) entsprechend einer Ausbeute von 37% bez. des Racemats erhalten. Die Analytik wurde gemäss Beispiel 1.1.1 durchgeführt.

**1.1.5.3** 2,77 kg (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (Gehalt 95,8%), 1,35l 1-Propanol und 355,5 ml Savinase gemäss Beispiel 1.1.1 wurden bei 40°C und einem pH-Wert = 7,4 (eingestellt durch Zugabe

von 92 g 4N NaOH) in einem 5 l Ruhrreaktor umgesetzt. Hierbei wurde der pH-Wert durch Zugabe von 4N NaOH bei pH = 7,4 konstant gehalten. Nach 14 h wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 20%iger Schwefelsäure auf pH = 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 1,15 l Toluol wurden die Phasen getrennt und die organische Phase im Vakuum destilliert (Produktfraktion bei T=72-76°C, p=1 mbar). Es wurden 1,07 kg Produkt (Gehalt 91%, ee = 98,4%) entsprechend einer Ausbeute von 36,5% erhalten. Der Gehalt des Produkts wurde mittels GC auf einer Optima5-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt. Der ee des Produkts wurde mittels GC auf einer chiralen LipodexE-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt.

#### 1.1.5.4

#### Isolation von (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäurepropylester

345 g des Blasenrests aus Beispiel 1.1.5.3 wurden mit 250 ml Essigsäureethylester und 1 l Hexan versetzt und das Gemisch wurde auf Rückfluss erhitzt. Es bildeten sich zwei Phasen, die obere Phase wurde abgetrennt und langsam auf 0°C abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und bei 40°C im Vakuum getrocknet. Es wurden 85,6 g farbloses Produkt erhalten.

Der ee-Wert wurde mittels GC auf einer chiralen Hydrodex-β-PM-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) bestimmt, ee = 93%.

$\alpha_{D,20}^c$  (c=1, MeOH) = 79,3°

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ : 5,91 (br. 1H)

5,89 (s, 2H)

5,07 (m, 1H)

4,07 (t, 2H)

3,50 (m, 1H)

2,46 (m, 1H)

1,96 (s, 3H)

1,90 (m, 1H)

1,67 (m, 2H)

0,96 (t, 3H)

#### 1.1.6 mittels Protease von *Bacillus subtilis* in Phosphat-Puffer

**1.1.6.1** 25 mg *Bacillus subtilis* Protease (Fluka 82490), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 6 h war alles (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. 1,5 h nach Inkubation war der Enantiomerenüberschuss von (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on >98%. Die nicht isolierte Ausbeute betrug 12% bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

**1.1.6.2** 125 mg *Bacillus subtilis* Protease (Fluka 82490), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 6 h war 90% des (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. 1,5 h nach der Inkubation war der Enantiomerenüberschuss von (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on >98%. Die nicht isolierte Ausbeute betrug dann 12% bez. des Racemats.

### **1.1.7 mittels Protease von *Aspergillus oryzae* in Phosphat-Puffer**

**1.1.7.1** 25 mg *Aspergillus oryzae* (Sigma P-4032, 3.5 Units/mg), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >40% bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1.1.1 beschrieben bestimmt.

**1.1.7.2** 125 mg *Aspergillus oryzae* (Sigma P-4032, 3.5 Units/mg), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-)

2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >40% bez. des Racemats.

### 1.1.8 mittels Proteinase K von *Tritirachium albumin* in Phosphat-Puffer

**1.1.8.1** 25 mg Proteinase K (Sigma P-8044 1 – 7 Units/mg), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 40% bez. des Racemats. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

**1.1.8.2** 125 mg Proteinase K (Sigma P-8044 1 – 7 Units/mg), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 0,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 30% bez. des Racemats.

## 1.2 Herstellung von (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (mittels Lipase von *Candida antarctica*)

**1.2.1** 25 mg SP525 (Novo Nordisk), 0,45 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 0,5 ml n-Propanol und 0,05 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on wurden

bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 0,5 h war alles (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (-) (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 12%. Gehalt und Enantiomerenüberschuss wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bestimmt.

1.2.2 250 mg SP525 (Novo Nordisk), 2,25 ml Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5), 2,5 ml n-Propanol und 2,25 ml (+/-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (Gehalt: 95,4%) wurden bei 30 °C (+/- 2 °C) inkubiert. Der pH Wert wurde durch manuelle Zugabe von 1 N NaOH bei 7,5 gehalten, wobei Schwankungen von +/- 0,5 pH erreicht wurden. Proben wurden gemäss Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 16 h war alles (-) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on umgesetzt. Der Enantiomerenüberschuss für (+) (1S,4R)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war >98%. Die analytische Ausbeute bezogen auf (+) 2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on war 12% bez. des Racemats.

### 1.3. Reduktion von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on zu (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten

1.3.1 Zu einer Lösung von (1R,4S)-2-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1] hept-5-en-3-on (50 g, 0,33 mol), 40 ml Wasser, 240 ml 2-Butanol wurden portionsweise 8 g NaBH<sub>4</sub> zugegeben und die Temperatur unter 5°C gehalten. Nach 1 h wurde die Reaktion gestoppt und dann die Reaktionsmischung mit HCl konz. auf pH 2,0 eingestellt. Die Reaktionstemperatur wurde unter 10°C gehalten. Der pH-Wert wurde mit 30%-iger NaOH auf pH 9,0 eingestellt. Natriummetaborat wurde abfiltriert und die Wasserphase wurde dreimal mit 2-Butanol extrahiert. Nach Abdampfen von 2-Butanol wurden 49,3 g Produkt (0,28 mol) entsprechend einer Ausbeute von 88% erhalten.

1.3.2. 287.4 g (-)-Acetyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on (100 %-ig  $\Rightarrow$  ~ 255 ml, 97 %-ig, 1.9 mol) wurden in 380 ml Wasser und 1217 ml 2-Butanol gelöst. Die Lösung wurde auf 0 bis -2 °C gekühlt.

In einem anderen Ruhrwerk wurden 45 g NaBH<sub>4</sub> (1.188 mol, 1.25 Eq) in 304 ml frisches 2-Butanol suspendiert. Die NaBH<sub>4</sub>-Suspension wurde innerhalb 1 - 2 Stunden in die Lösung zugegeben. Die Reaktion war exotherm und die Temperatur durfte 5 °C nicht überschreiten. Vor einer Portionzugabe musste die Temperatur bei 0 °C liegen. Die Reaktion wurde mittels DC (Hexan/Etrol/MeOH : 5/5/1) verfolgt. Nach der Zugabe wurde noch 1 bis 2 h nachreagieren gelassen. Der Umsatz wurde kontrolliert. Wenn der Umsatz in Ordnung war, (Konzentration an Edukt sollte < 1.0% sein) wurde mit ca. 135 g konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Die Temperatur wurde unter 10 °C gehalten. Dann wurde sofort mit ca. 85 ml 30 %-ige Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Die ausgefallenen Salze wurden filtriert und mit 127 ml frischem 2-Butanol gewaschen. Das Filtrat und das "Wasch-2-Butanol" wurden gesammelt und die Phasen getrennt. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit je 380 ml frischem 2-Butanol extrahiert. Die 2-Butanol-Phasen wurden gesammelt. Man erhielt ca. 2450 g 10 %-ige Lösung Produkt, (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten in 2-Butanol. Dies entsprach ca. 250 g 100 %-iges Produkt (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten, entsprechend einer Ausbeute von 85%.

#### 1.4. Hydrolyse von (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten zu (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten

1.4.1 Zu 49.3 g (0.28 mol) (1R,4S)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten wurde 30 %-ige NaOH (45 g) zugegeben und die Suspension auf 100 °C erwärmt. Nach 3.5 h wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und dann mit konz. HCl auf pH = 1.0 eingestellt. Dann wurde Wasser abgedampft und NaCl abfiltriert. Anschliessend wurde Pentanol (2 ml pro g Rest) und Aceton (6 ml pro g Rest) hinzugegeben und das ausgefallene Präzipitat filtriert und mit 20 ml Aceton gewaschen. Es wurden 37.5 g (0.24 mol) Produkt als Hydrochloridsalz mit einem ee = 99%, entsprechend einer Ausbeute von 86% erhalten.

1.4.2. 85,4 g (-)-2-Acetyl-1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten 100 %-ig (0,55 mol) als 10 %-ige Lösung in 2-Butanol wurden vorgelegt. Es wurde dann destilliert bis kein Destillat mehr kommt. Anschliessend wurden 110,0 g 30 %-ige Natronlauge ( $\Rightarrow$  33,0 g NaOH 100 %-ig, 0,825 mol, 1,5 Eq) und 65 g Wasser zugegeben. Das restliche 2-Butanol wurde durch azeotrope Destillation entfernt (mit ca. 10 g Wasser). Dann wurde die Lösung unter Rückfluss (100 – 110 °C) für 4 – 5 h erhitzt. Die Reaktion wurde mittels GC verfolgt. Wenn der Umsatz in Ordnung war, wurde auf 50 °C abgekühlt und 154 ml 2-Butanol (124,3 g) wurden zugegeben. Die Phasen wurden bei 50 °C getrennt und die Wasserphase nochmals mit 154 ml 2-Butanol (124,3 g) bei 50 °C extrahiert (15 Min Rühren, Phasen trennen). Die Wasserphase (ca. 165 g) wurde entsorgt. Die organischen Phasen wurden gesammelt und ca. 22 g Chlorwasserstoff wurden bei 20 – 40 °C bis pH 1 zugegeben. Einige Salze fielen während des Ansäuerns aus. Diese Salze wurden bei 20 °C filtriert und das Filtrat wurde unter Normaldruck destilliert bis 220 ml Destillat (ca. 180 g) aufgefangen waren (Kochtemperatur ca. 91 – 92 °C). Danach wurden bei ca. 70 °C 176 ml Aceton (139,0 g) zugegeben. Die Suspension wurde 15 bis 30 min unter Rückfluss gerührt und dann auf –5 °C abgekühlt. Nach 1 h bei dieser Temperatur wurde die Suspension abgenutscht und der Filterkuchen mit 154 ml Aceton gewaschen. Man erhielt 70,0 g (-)-Produkt 100 %-ig entsprechend einer Ausbeute von 85 %.  
Gehalt: 99,0 % (Tit., wt. %)  
NaCl: 0,5 bis 1,0 %

## Beispiel 2

### Herstellung von (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

#### 2.1. Herstellung von racemischem ( $\pm$ )-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

109,13 g racemisches 2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden mit 182,1 g Triethylamin, 6,11 g 4-Dimethylaminopyridin und 500 ml Acetonitril gemischt. Die Reaktion wurde auf 50 °C erwärmt. Danach wurde portionenweise 195,3 g Ethylchlorformiat, gelöst in 150 ml Acetonitril, zugegeben. Die Temperatur wurde unter 55 °C gehalten. Nach Reaktionsende wurde die Lösung auf 20 °C gekühlt und die Salze wurden abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde bei 60 °C und 20 mbar eingedunstet und anschliessend in 1500 ml Toluol aufgenommen. Darauf folgten 3 Extraktionen mit 250 ml Wasser, pH 8, mit 250 ml

Essigsäure (1%), mit 250 ml gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wurde mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und bei 80 °C/20 mbar eingedunstet. 167,4 g eines braunen Öles wurden erhalten. Der Gehalt nach GC war 96 % ( $\pm$ )-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurde gereinigt durch Vakuumdestillation,  $b_{\text{red}} = 76,5$  °C, Gehalt (GC) = 99,5 %, Ausbeute = 156,6 g (88,5 %)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

1,33 (t, 3H),  
 2,19 (d, 1H),  
 2,38 (d, 1H),  
 3,43 (s, 1H),  
 4,26 (m, 2H),  
 5,04 (s, 1H),  
 6,68 (m, 1H),  
 6,92 (m, 1H)

## 2.2 Herstellung von (-)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

Analog zu Beispiel 2.1 wurde das Produkt ausgehend von (-)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on hergestellt.

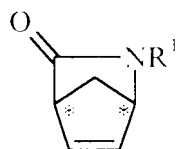
## 2.3 Herstellung von (1R,4S)-2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on

500  $\mu\text{l}$  Savinase gemäss Beispiel 1.1.1, 5 ml n-Propanol, 4,5 ml (50 mM Phosphatpuffer pH 8/Tetrahydrofuran, 1/1) und 250  $\mu\text{l}$  (+/-) Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on wurden bei 40 °C bei pH 8 inkubiert. Durch manuelle Zugabe von 1N NaOH wurde der pH Wert auf 8 gehalten. Proben wurden wie in Beispiel 1.1.1 entnommen. Nach 4,5 h wurde ein ee Wert von >98 % für das (-) Enantiomere gemessen, was anhand des hergestellten Standards (Beispiel 2.2) bewiesen wurde. Die nichtisolierte, analytische Ausbeute bezogen auf das Racemat betrug 46 %.

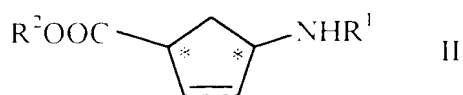


# **Patentansprüche**

- 1 Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Verbindungen der allgemeinen  
5 Formeln

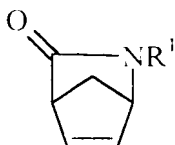


I



II

- 10 worin R¹ Acyl oder Acyloxy und R² ein Wasserstoffatom oder C<sub>1-10</sub>-Alkyl bedeutet,  
worin ein racemisches Lactam der allgemeinen Formel



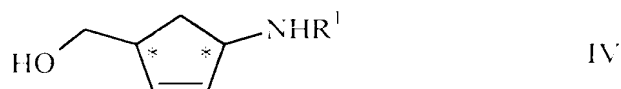
III

- 15 mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer  
Base in einem konstanten pH-Bereich umgesetzt wird

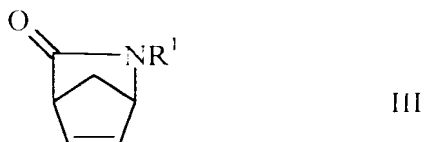
- 2 Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Hydrolase eine  
Protease oder Lipase verwendet.
- 20 3 Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Protease eine  
Serinprotease verwendet
- 4 Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Serinprotease ein  
Subtilisin verwendet
- 25 5 Verfahren nach mindesten einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,  
dass man als racemisches Lactam der allgemeinen Formel III 2-Acetyl-2-  
azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on oder 2-Ethoxycarbonyl-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-  
3-on einsetzt
- 30 6 Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
dass man die Umsetzung in Wasser, einer Pufferlösung, einem C<sub>1-4</sub>-Alkohol oder in  
einem Gemisch aus diesen mit einem aprotischen organischen Lösungsmittel  
durchführt

7 Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung bei einer Temperatur von 10 bis 60°C durchführt

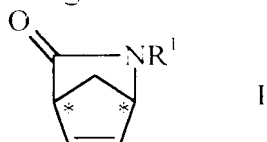
5 8 Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-Derivaten der allgemeinen Formel



10 worin R¹ die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lactam der allgemeinen Formel

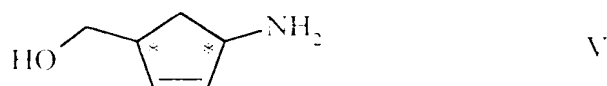


15 worin R¹ die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich in die Verbindung der allgemeinen Formel



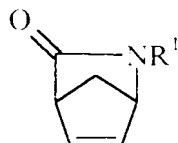
20 überführt und diese dann zu der Verbindung der allgemeinen Formel IV reduziert.

9 Verfahren zur Herstellung von (1R,4S)-1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten der Formel



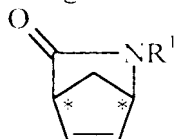
25

bzw. dessen Salze, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lactam der allgemeinen Formel



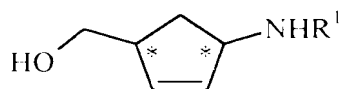
III

worin  $R^1$  die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich in die Verbindung der allgemeinen Formel



I

worin  $R^1$  die in Anspruch 1 genannte Bedeutung hat, überführt, diese dann in die Verbindung der allgemeinen Formel



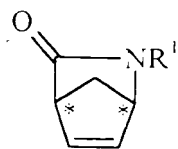
IV

worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, reduziert und diese dann zu der Verbindung der Formel V hydrolysiert.

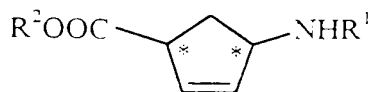
- 15    10    (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäure- $C_{2-10}$ -alkylester, ausgenommen (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäureethylester.
- 11    (1S,4R)-Acetylamino-2-cyclopenten-1-carbonsäureethyl- oder propylester.

# Zusammenfassung

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln

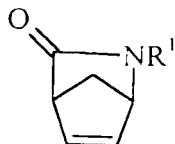


I



II

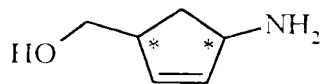
worin R¹ Acyl oder Acyloxy und R² ein Wasserstoffatom oder C<sub>1-10</sub>-Alkyl bedeutet, umfassend die Umsetzung eines Lactams der allgemeinen Formel



III

mittels einer Hydrolase in Gegenwart eines Nucleophils und in Gegenwart einer Base in einem konstanten pH-Bereich.

Desweiteren wird die Weiterumsetzung der Verbindung der allgemeinen Formel I in das optisch aktive 1-Amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten der Formel



V

beschrieben

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

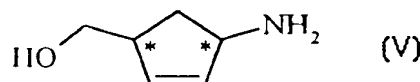
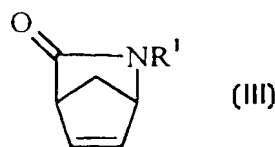
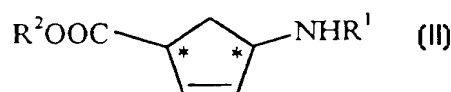
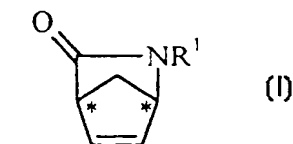


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12P 41/00, 17/10, 13/00, 13/02, C07C 233/52</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/03032</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	20. Januar 2000 (20.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99-04814</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>8. Juli 1999 (08.07.99)</b>			
(30) Prioritätsdaten: 98112719.4      9. Juli 1998 (09.07.98)      EP 98123949.4      17. Dezember 1998 (17.12.98)      EP			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>LONZA AG [CH/CH]; Munchensteinerstrasse 38, CH-4052 Basel (CH).</b>			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>BIERNEGGER-EGLI, Christine [CH/CH]; Bahnhofstrasse, CH-3985 Münster (CH). BRUX, Frank [CH/CH]; Haus Formes, CH-3942 Raron (CH). RODUIT, Jean, Paul [CH/CH]; Loos, CH-3979 Grône (CH). WERBITZKY, Oleg [DE/CH]; Terbinerstrasse 12, CH-3930 Visp (CH). GUGGISBERG, Yves [CH/CH]; Avenue du Rothorn 11, CH-3060 Sierre (CH).</b>			
(74) Anwälte: <b>RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl &amp; Partner, Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising (DE).</b>		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: **METHOD FOR PRODUCING (1R,4S)-2-AZABICYCLO[2.2.1]HEPT-5-EN-3-ON DERIVATIVES**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (1R,4S)-2-AZABICYCLO[2.2.1]HEPT-5-EN-3-ON-DERIVATEN**



(57) Abstract

The invention relates to a biotechnological method for producing compounds of general formulas (I) and (II), wherein R¹ represents acyl or acyloxy, and R² represents a hydrogen atom or C₁-C₁₀ alkyl, comprising the reaction of a lactam of general formula (III) using a hydrolase in the presence of a nucleophile and in the presence of a base in a constant pH range. The invention also relates to the subsequent conversion of the compound of general formula (I) into the optically active 1-amino-4-(hydroxymethyl)-2-cyclopentene of formula (V).